

Relative Mobilität

In Anbetracht der Tatsache, daß die absolute Mobilität von zahlreichen Einflüssen (wie von den Eigenschaften der Pufferlösung und des Support-Mediums, von der Temperatur usw.) abhängt, charakterisiert man die Wanderung eines Kohlenhydrates mit seiner relativen Mobilität, indem seine Mobilität mit der Mobilität einer gewählten Substanz verglichen wird. Man spricht von

Mg, Mr, Ms, Ma, Mm-Werten usw., wenn die absoluten Distanzen der untersuchten Kohlenhydrate durch die absoluten Distanzen der Glukose, Ribose, Glucitol, Albumin oder Mannan dividiert werden. Man muß also eigentlich nicht die absoluten Mobilitäten miteinander vergleichen, sondern es genügt, wenn wir mit den absoluten Distanzen operieren.

Literatur

1. BOESEKEN, J., *Advances Carbohydrat Chemistry* 4, 189 (1949).
- 2. SANGER, F., *Biochem. J.* 44, 126 (1949).
- 3. CONSDEN, R. und A. H. GORDON, *Biochem. J.* 46, 8 (1950).
- 4. MICHL, H., *Mh. Chem. (Wien)* 82, 489 (1951).
- 5. KUNKEL, H. G. und A. TISELIUS, *J. gen. Physiol.* 35, 89 (1951).
- 6. CLOTTEN, R. und A. CLOTTEN, *Hochspannungselektrophorese*, S. 39. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962).
- 7. GELDMACHER-MALLINKRODT, M. und H. WIELAND, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 292, 65 (1953).
- 8. HONEGGER, G. H., in: E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie* S. 449. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).
- 9. FRAHN, J. L. und J. A. MILLS, *Austral. J. Chem.* 12, 65 (1959).
- 10. CONSDEN, R. und W. M. STANIER, *Nature (London)* S. 4306, 783 (1952).
- 11. MESTER, L., E. MOCZAR, G. MEDGYESI und K. LAKI, *C. R. Acad. Sc. t. 256*, 3210 (Frankreich).
- 12. SCOTT, T. S. *Chem. and Ind.* 1245 (1953).
- 13. HARRIS, G. I. C. MC. WILLIAM, *Chem. and Ind.* 249 (1954).
- 14. STAHL, E., *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).
- 15. STAHL, E. und V. KALTENBACH, *J. Chromatogr.* 5, 351 (1961).
- 16. PASTUSKA, G., *Z. analyt. Chem.* 179, 427 (1961).

Dr. med. G. Medgyesi
5483 Bad Neuenahr
Hochstr. 23 u. 33

Zur Bestimmung körpereigener Amine in biologischen Substraten

III. Mitteilung: Bestimmung von 5-Methoxytryptamin und Serotonin in Blut und Harn

Von H. GROSS und FR. FRANZEN

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Köln (Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. H. W. Knipping)

(Eingegangen am 7. Januar 1965)

Es wird ein fluorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von 5-Methoxytryptamin und Serotonin in Blut und Harn besprochen, das auf der Umsetzung mit 3-Ketobutyraldehyd-1-dimethylazetal und Wasserstoffperoxyd beruht. Unter Extraktion mit Benzol gelangt nur 5-Methoxytryptamin in den Analysengang und wird selektiv bestimmt. Unter Essigsäureäthylesterextraktion werden dagegen beide Amine quantitativ erfaßt, so daß die Differenz der beiden unter Verwendung verschiedener Extraktionsmittel festgestellten Analysenergebnisse dem vorliegenden Serotoningehalt entspricht.

Mit Hilfe des besprochenen Verfahrens wurde erstmalig 5-Methoxytryptamin im Harn ($36,55 \pm 5,23 \mu\text{g}/24 \text{ Std.}$) nachgewiesen. Im normalen menschlichen Blut wurden nur bei 4 von 50 untersuchten Personen 5-Methoxytryptamin gefunden, und zwar in der Größenordnung von $0,038 \mu\text{g}/\text{ml}$.

A fluorimetric method is described for the determination of 5-methoxytryptamine and serotonin in blood and urine. It is based on the reaction with 3-oxobutyraldehyde-1-dimethylacetal and hydrogen peroxide. 5-Methoxytryptamine is selectively extracted with benzene and determined alone. Both amines are quantitatively extracted with ethyl acetate, so that the difference between the results obtained with the two extracting solvents represents the amount of serotonin.

With the aid of the above method, 5-methoxytryptamine was demonstrated in urine ($36,55 \pm 5,23 \mu\text{g}/24 \text{ hr.}$) for the first time. 5-Methoxytryptamine was found in the blood of only 4 out of 50 normal humans, in the order of $0,038 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Methoden zum Nachweis des 5-Methoxytryptamins liegen unseres Wissens noch nicht vor. — Zur Bestimmung des Serotonins (= 5-Hydroxytryptamin) in biologischen Substraten stehen biologische, chromatographische, spektralphotometrische, fluorimetrische und histochemische Verfahren zur Verfügung.

Die biologischen Methoden erlauben zwar unter Auswertung des pharmakologischen Effektes von Serotonin auf isolierte Organe (z. B. Rattenuterus (1—10) bzw. -dickdarm (11), Kaninchenohr (12, 13), Molluskenherz (14, 15)) den Nachweis von $10^{-9} \text{ g Amin/ml}$,

weisen jedoch — abgesehen von der verfahrenseigenen Problematik, dabei insbesondere der Schwierigkeit einer quantitativen Auswertung — den Nachteil mangelnder Spezifität (16) gegenüber anderen im gleichen Substrat vorliegenden Indolverbindungen¹⁾ auf.

Die chromatographischen Methoden, deren untere Erfassungsgrenze bei papierchromatographischer (17—23), papierelektrophoretischer (24, 25) bzw. hochspannungselektrophoretischer (26, 27) Trennung günstigenfalls

¹⁾ Z. B. Methylserotonin, Bufotenin, 5-Methoxytryptamin, Tryptamin, Methyl- und Dimethyltryptamin.

10^{-7} g Serotonin, bei Säulenchromatographie mit anschließender biologischer (28, 29) oder fluorimetrischer (30, 31) Auswertung der eluierten Fraktionen etwa 10^{-9} g Amin beträgt, eignen sich im Hinblick auf die benötigten großen Substratmengen sowie den hohen Zeitaufwand nicht für Routineuntersuchungen.

Dem *spektralphotometrischen* (32) Verfahren haftet vor allem der Nachteil geringer Empfindlichkeit an (10^{-6} g Amin/ml). — Die *spektrophotofluorimetrischen* Methoden (33–39), die sich durch eine Nachweisgrenze von 10^{-9} g Serotonin/ml auszeichnen, erfassen in der bisher vorliegenden Form auch Homologe wie Methylserotonin, Bufotenin und 5-Methoxytryptamin. — Die *histochemischen* Verfahren (40, 41) erlauben lediglich einen qualitativen Nachweis von Serotonin.

Versuche

Untersuchungen zur selektiven Serotoninbestimmung

Unsere Untersuchungen galten dem Ziel, Serotonin durch chemische Umsetzung in eine Verbindung zu überführen, deren Fluoreszenzeigenschaften eine selektive Bestimmung auch in Anwesenheit verwandter fluoreszierender Verbindungen erlaubt. Während Versuche unter Umsetzung der primären Aminogruppe des Serotonins mit den in Fußnote¹⁾ aufgeführten Carbonylverbindungen und anschließender Oxydation²⁾ nicht zu geeigneten Fluorophoren führten, erwies sich die Kondensationsreaktion mit 3-Ketobutyraldehyd-1-dimethylazetal (= „KBA“) und anschließende Oxydation mit Wasserstoffperoxyd als gangbarer Weg.

Umsetzung des Serotonins mit KBA und Wasserstoffperoxyd

Zur Ermittlung eines wasserlöslichen, die fluorimetrische Bestimmung nicht beeinträchtigenden Lösungsmittels für KBA wurde eine 0,1 mg-proz. schwefelsaure Serotoninlösung mit 5-proz. KBA (gelöst in Wasser, Methanol, Äthanol, Dioxan, Azeton bzw. Dimethylformamid) versetzt, 20 Min. im Wasserbad auf 90°

Tab. 1

Einfluß des KBA-Lösungsmittels auf die Fluoreszenzintensität einer mit KBA/H₂O₂ umgesetzten Serotoninlösung

Lösungsmittel	Fluoreszenzintensität der Serotoninlösung
Wasser	4,5
Methanol	4,6
Äthanol	14,5
Dioxan	17,8
Aceton	24,8
Dimethylformamid	26,8

¹⁾ Azeton, Azetylazeton, Azetonylazeton, 2-Azetonazetyl-4-methylphenol, Azetaldehyd, 3,4-Dimethoxybenzaldehyd, 2,6-Dimethylchromon, Dimethylaminobenzaldehyd, Formaldehyd, Glyoxal, Glyoxylsäure, Glutaconaldehyd, 5-Nitrosalicylaldehyd, Phthalaldehyd, Phthalaldehydsäure, Pyridoxal, Salizylaldehyd, Trifluorazeton, Trifluorazetylazeton, Vanillin, Xanthidrol.

²⁾ Ammoniumpersulfat, Jod, Kaliumpersulfat, Natriumperborat, aktiviertes Mangandioxyd, Quecksilber-II-azetat, Selendioxyd, Wasserstoffperoxyd.

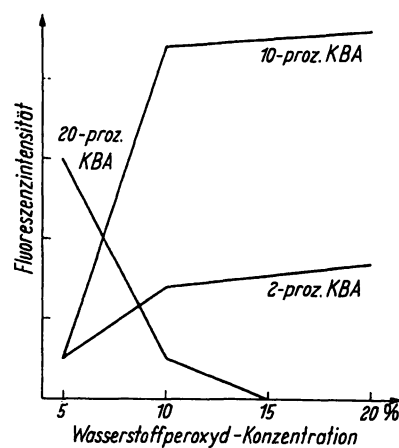


Abb. 1

Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität einer Serotoninlösung von der Wasserstoffperoxyd-Konzentration bei verschiedenen KBA-Konzentrationen

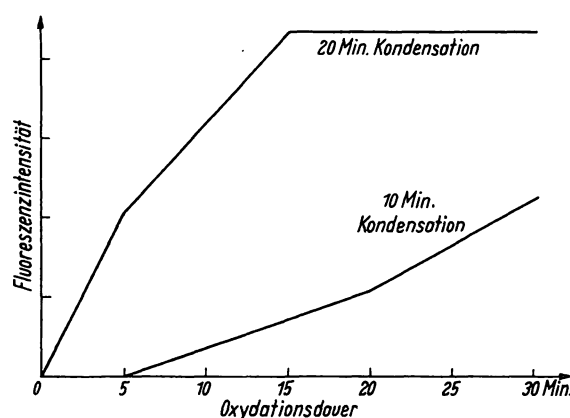


Abb. 2

Fluoreszenzintensität einer Serotoninlösung in Abhängigkeit verschiedener Kondensations- und Oxydationszeiten mit 10-proz. KBA- bzw. 10-proz. H₂O₂-Lösung

erwärmt, unter den gleichen Bedingungen oxydiert, und das Reaktionsgemisch fluorimetriert. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, erwies sich Dimethylformamid unter Zugrundelegung der Fluoreszenzintensität der Meßlösung als das optimale der untersuchten Lösungsmittel. — In gleichartiger Versuchsanordnung wurde Wasserstoffperoxyd als das geeignete der untersuchten Oxydationsmittel festgestellt; dabei waren die hohe, konstante Fluoreszenzintensität der Aminprobe und die nur geringe Fluoreszenz des Blindwertes maßgebend. Im Hinblick auf eine maximale Fluoreszenzintensität des Fluorophors wurden sodann in gleicher Versuchsanordnung die optimalen Reaktionsbedingungen bezüglich der KBA- und Wasserstoffperoxydkonzentration, der Kondensations- und Oxydationszeit, des pH sowie des Extraktionsmittels für den KBA-Überschuß ermittelt. Wie aus den Abbildungen 1–3 hervorgeht, ergibt die Umsetzung des Serotonins mit 10-proz. KBA- und 10-proz. H₂O₂-Lösung nach je 20 Min. Kondensation bzw. Oxydation bei pH 1 und 90° Wasserbadtemperatur die maximale Fluoreszenzintensität des Fluorophors. Zur Entfernung des überschüssigen KBA sowie des durch dessen Selbstkondensation gebildeten 1,3,5-Triazetylbenzols erwies sich Azetylen-

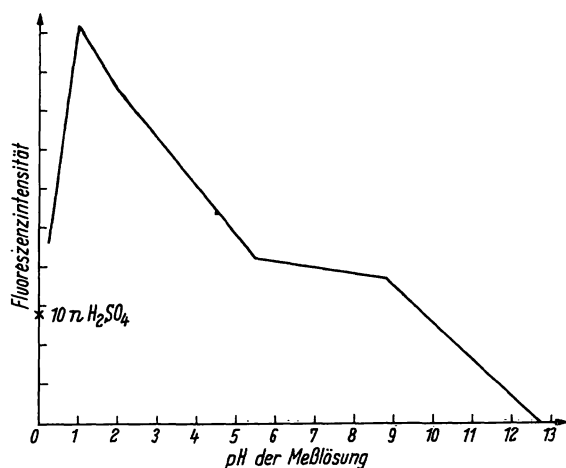


Abb. 3

Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Serotonin-Fluorophors vom pH der Lösung

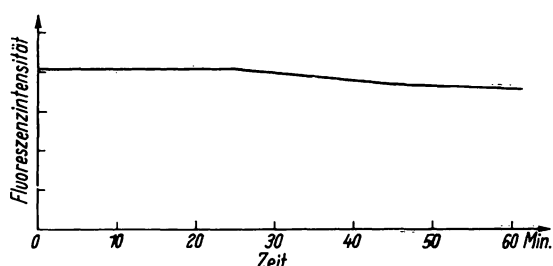


Abb. 4

Fluoreszenzintensität des Serotonin-Fluorophors in Abhängigkeit von der Zeit

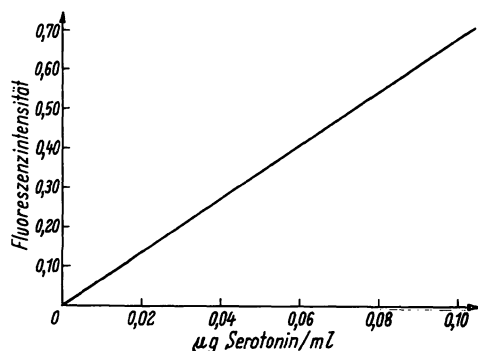


Abb. 5

Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Serotonin-Konzentration

tetrachlorid als geeignet. Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, bleibt die Fluoreszenzintensität des Fluorophors bis 20 Min. nach Extraktion des überschüssigen KBA konstant, um dann eine langsame, aber stete Abnahme zu erfahren; das besagt, daß die Meßlösung innerhalb dieser Zeit fluorimetriert werden muß.

Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Serotoninkonzentration

Zur Untersuchung der Frage nach der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Aminkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe von 0,01–0,1 µg Serotonin/ml nach der für die Bestimmung im Harn nachfolgend noch näher besprochenen Methode analysiert. Die graphische Darstellung der Bezugsgrößen (Abb. 5)

ergab eine durch den Nullpunkt führende Gerade und damit den Nachweis der linearen Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Serotoninkonzentration.

Auswertung der fluorimetrischen Analyse

Die Auswertung der fluorimetrischen Meßdaten kann, wie in der 1. Mitteilung grundsätzlich besprochen, mit Hilfe einer Eichkurve, unter Verwendung einer Verfahrenskonstanten oder durch Bezugnahme auf Standardwerte erfolgen.

Störeinfluß anderer Verbindungen

Phenylaethylamin, Tyramin, Dopamin, l-Noradrenalin, Adrenalin, Isopropylnoradrenalin, Methyltryptamin¹⁾, Dimethyltryptamin²⁾, Histamin, Methyl- und Dimethylamin, Äthylamin, Kolamin, Allylamin, Putreszin, Kadaverin, Taurin, Harnstoff, Guanidin, Dimethylguanidin, Kreatin und Kreatinin sind aufgrund eigener Untersuchungen ohne Einfluß auf das vorstehend grundsätzlich erörterte Verfahren zur Serotoninbestimmung, da diese Verbindungen entweder durch den Analysengang entfernt werden oder mit KBA/H₂O₂ keine die Serotoninbestimmung störende Reaktion eingehen oder in anderen Wellenbereichen fluoreszieren.

Tryptamin, Methylserotonin und Bufotenin³⁾ vermögen grundsätzlich ab einer bestimmten Konzentration das besprochene Verfahren der Serotoninbestimmung im Sinne eines Plusfehlers zu beeinträchtigen. Setzt man einer Modellösung von 0,1 µg Serotonin/ml steigende Mengen vorgenannter Amine zu, so ist für Tryptamin die 45-fache, für Methylserotonin die 13-fache, für Bufotenin die 11-fache Konzentration erforderlich, um das Analysenergebnis um einen Plusfehler von 3% zu erhöhen. Abgesehen davon, daß derartige Konzentrationsverhältnisse nach heutigem Wissensstand in menschlichen Substraten nicht zu erwarten sind, besteht im Zweifelsfall die Möglichkeit, die vorliegende Konzentration der interferierenden Basen durch Zusatzanalysen zu ermitteln.

5-Methoxytryptamin reagiert dagegen wie Serotonin mit KBA und H₂O₂ unter Bildung eines in den gleichen Wellenbereichen fluoreszierenden Fluorophors. Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, ist dessen Fluoreszenzintensität

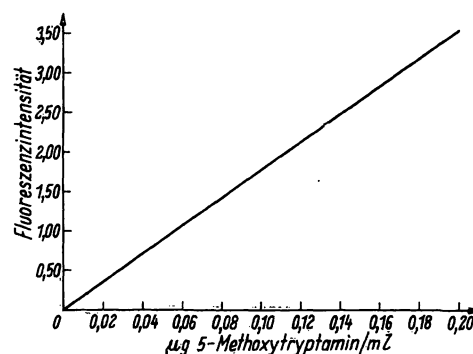


Abb. 6

Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der 5-Methoxytryptamin-Konzentration

¹⁾ In menschlichen Substraten bisher noch nicht nachgewiesen.

²⁾ Von uns in normalem menschlichem Blut und Harn nachgewiesen.

³⁾ Von uns in normalem menschlichem Blut nachgewiesen.

tät der 5-Methoxytryptamin-Konzentration proportional. Die untere Erfassungsgrenze beträgt $0,005 \mu\text{g}$ 5-Methoxytryptamin/ml. — Liegen 5-Methoxytryptamin und Serotonin im gleichen Substrat vor, lassen sich beide unter folgendem Vorgehen quantitativ bestimmen: 5-Methoxytryptamin wird aus einem aliquoten Teil der alkalisierten Ausgangslösung ($\text{pH} > 11$) mittels Benzol extrahiert, die benzolische Phase mit NaOH gewaschen, das 5-Methoxytryptamin mittels verdünnter Schwefelsäure aus der benzolischen Phase extrahiert und zur Fluorophorbildung mit KBA/ H_2O_2 versetzt. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, wird in diesem Trennungsgang nur 5-Methoxytryptamin erfaßt, während Serotonin in der alkalischen wäßrigen Phase verbleibt. Zur Bestimmung des Serotonins wird ein weiterer aliquoter Teil der Ausgangslösung alkalisiert ($\text{pH} = 10$), aus diesem 5-Methoxytryptamin und Serotonin mittels Essigsäureäthylester extrahiert, in verdünnte Schwefelsäure aufgenommen und zur Fluorophorbildung mit KBA und H_2O_2 versetzt. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, werden hierbei beide Amine quantitativ erfaßt. Die Differenz der fluorimetrischen Meßergebnisse der Substratproben II und I entsprechen dann der vorliegenden Serotoninkonzentration.

Nachfolgend sei kurz das Vorgehen zur Bestimmung von 5-Methoxytryptamin und Serotonin in Harn und Blut besprochen.

Tab. 2

Ausbeute bekannter 5-Methoxytryptamin- und Serotoninmengen nach Extraktion mit Benzol bzw. Essigsäureäthylester

Extraktionsmittel	Vorgelegte Aminmengen $\mu\text{g/ml}$		Wiedergefundenes Amin in %	
	5-Methoxytryptamin	Serotonin	5-Methoxytryptamin	Serotonin
Benzol	0,20		99	
	0,40		98	
	0,50		98	
	0,80		97	
	0,20	0,05	98	0
	0,40	0,10	98	0
	0,50	0,15	96	0
	0,80	0,25	98	0
	0,20		95	
	0,40		96	
Essigsäureäthylester	0,50		96	
	0,80		95	
		0,05		97
		0,10		96
		0,15		95
		0,25		96
	0,20	0,05	95	97
	0,40	0,10	102	96
	0,50	0,15	96	95
	0,80	0,25	95	96
	0,20	0,25	95	96
	0,80	0,05	96	97

Bestimmung von 5-Methoxytryptamin und Serotonin in Harn und Blut

5-Methoxytryptamin im Harn

20 ml des unter Vorlage von 20 ml 3 *n*-HCl gesammelten 24-Stdn.-Harns werden mit 0,5 ml Titriplex-III-Lösung¹⁾ versetzt, mit 33-proz. NaOH auf $\text{pH} > 11$ eingestellt, und nach Zugabe von 5 g NaCl²⁾ zur Extraktion des 5-Methoxytryptamins mit 30 ml Benzol 10 Minuten geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die abpipettierte benzolische Phase wird zwecks Entfernung noch vorhandenen Serotonins 2-mal mit je 5 ml 0,1 *n*-NaOH 5 Minuten gewaschen und zentrifugiert. 15 ml der organischen Phase werden zur Überführung des 5-Methoxytryptamins in eine wäßrige Lösung mit 3 ml 0,1 *n*-Schwefelsäure 10 Minuten geschüttelt und anschließend zentrifugiert. 2 ml der schwefelsauren Lösung werden zur Fluorophorbildung mit 0,1 ml 10-proz. KBA-Lösung (in Dimethylformamid) versetzt und 20 Minuten in einem Wasserbad von 90° erwärmt, anschließend nach Zugabe von 0,1 ml 10-proz. Wasserstoffperoxyds für weitere 20 Minuten bei gleicher Temperatur gehalten. Nach Erkalten wird das Reaktionsgemisch zwecks Entfernung des KBA-Überschusses mit 4 ml Azetylentetrachlorid 5 Minuten geschüttelt. 1 ml der wäßrigen Lösung wird dann bei der Aktivierungswellenlänge $\lambda = 385 \text{ m}\mu$ ³⁾ und der Fluoreszenzwellenlänge $\lambda = 455 \text{ m}\mu$ ³⁾ fluorimetriert. Gemäß linearer Ausgleichsrechnung (42) beträgt die Verfahrenskonstante für die 5-Methoxytryptaminbestimmung im Harn $0,057 \mu\text{g}$ Amin/ml ($\pm s_k = 0,003 \mu\text{g}$ Amin/ml) (s. Tab. 3). Zur Erfassung der Eigenfluoreszenz der Harnprobe — Gleiches gilt auch für die Aminbestimmung im Blut — kann in der Weise vorgegangen werden, daß einer zweiten, parallel zur Hauptbestimmung analysierten Substratprobe vor der H_2O_2 -Oxydation anstelle der 0,1 ml KBA-Lösung lediglich 0,1 ml Dimethylformamid zugesetzt werden. Der fluorimetrische Meßwert dieser Blindprobe ist von dem Hauptwert in Abzug zu bringen.

Serotonin (und 5-Methoxytryptamin) im Harn

3 ml des unter Vorlage von 20 ml 3 *n*-HCl gesammelten 24-Stdn.-Harns werden zur Entfernung etwa vorhandener Carbonylverbindungen in einem Schliffstopfen-Zentrifugenglas mit 5 ml einer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (0,5-proz. in 2 *n*-HCl) 20 Minuten geschüttelt. Die Extraktion des Reagensüberschusses sowie der gebildeten Hydrazone erfolgt durch zweimaliges Schütteln des Reaktionsgemisches mit je 20 ml Chloroform. Nach Zentrifugieren werden 5 ml der wäßrigen Phase nach Zugabe von 1 ml kalt gesättigter Titriplex-III-Lösung (Bindung mehrwertiger Kationen) mit festem Natriumkarbonat auf $\text{pH} = 9-10$ eingestellt, mit 2,5 g Natriumsulfat (Aussalzeffekt) sowie 2 ml 0,5 molaren Boratpuffers⁴⁾ versetzt und zur Extraktion des Serotonins und 5-Methoxytryptamins mit 20 ml Essigsäureäthylester 15 Minuten geschüttelt. Nach Zentrifugieren wird die organische Phase mit 15 ml Boratpuffer 5 Minuten geschüttelt. Zwecks Überführung der Amine in eine wäßrige Lösung werden 15 ml der organischen Phase unter Zugabe von 15 ml Heptan (zur Löslichkeitsverminderung der Amin-Hydrogensulfate in der organischen Phase) mit 3 ml 0,1 *n*- H_2SO_4 geschüttelt und zentrifugiert. Zur Fluorophorbildung werden 2 ml der schwefelsauren Lösung mit 0,1 ml 10-proz. KBA-Lösung (in Dimethylformamid) 20 Minuten in einem Wasserbad von 90° erwärmt, anschließend nach Zugabe von 0,1 ml 10-proz. Wasserstoffperoxyds für weitere 20 Minuten bei gleicher Temperatur gehalten. Nach Erkalten wird das Reak-

¹⁾ Zur Bindung mehrwertiger Kationen.

²⁾ Zur Löslichkeitsverminderung des 5-Methoxytryptamins in wäßriger Lösung (Aussalzeffekt).

³⁾ „Aminco-Bowman“-Spektrophotofluorimeter mit einer Photomultiplier-Röhre 1 P 28; die angegebenen Wellenlängen sind nicht korrigiert.

⁴⁾ 30,9 g Borsäure p. a. und 22 g Natriumhydroxyd p. a. werden in bidestilliertem Wasser gelöst; nach Erkalten wird die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt, mit Natriumsulfat sowie Essigsäureäthylester gesättigt und mit einem pH-Meter auf $\text{pH} = 10,2$ eingestellt.

Tab. 3

Verfahrenskonstante und Standardabweichung der 5-Methoxytryptaminbestimmung in Blut und Harn

Blut		Harn	
$b = \mu\text{g}$ Methoxytryptamin/ml	$W = \text{wahrer Meßwert}$	$b = \mu\text{g}$ Methoxytryptamin/ml	$W = \text{wahrer Meßwert}$
0,20	0,40	0,20	3,30
0,20	0,35	0,20	3,44
0,20	0,38	0,20	3,60
0,20	0,36	0,20	3,54
0,16	0,30	0,16	2,80
0,16	0,33	0,16	2,76
0,16	0,27	0,16	2,87
0,16	0,30	0,16	2,93
0,12	0,24	0,12	2,00
0,12	0,23	0,12	2,30
0,12	0,21	0,12	2,06
0,12	0,21	0,12	2,10
0,08	0,15	0,08	1,31
0,08	0,14	0,08	1,46
0,08	0,15	0,08	1,40
0,08	0,14	0,08	1,49
0,04	0,05	0,04	0,61
0,04	0,10	0,04	0,66
0,04	0,09	0,04	0,85
0,04	0,08	0,04	0,70
0,02	0,05	0,02	0,25
0,02	0,03	0,02	0,30
0,02	0,02	0,02	0,40
0,02	0,06	0,02	0,44

Verfahrenskonstante (42)

$$[\omega] = \frac{\Sigma bW}{\Sigma W^2} \mu\text{g/ml}$$

Standardabweichung (42) s_k :

$$s_k = \pm \sqrt{\frac{1}{f} \Sigma v_k^2} \mu\text{g/ml}$$

$$\Sigma v_k^2 = \Sigma b^2 - [\omega] \Sigma bW$$

	Blut	Harn
ΣbW	0,6592	6,2022
ΣW^2	1,2356	108,995
$[\omega]$	0,5335	0,0569
$f = n - 1$	23	23
Σb^2	0,3536	0,3536
s_k	0,009	0,003

Tab. 4

Verfahrenskonstante und Standardabweichung der Serotoninbestimmung in Blut und Harn

Blut		Harn	
$b = \mu\text{g}$ Serotonin/ml	$W = \text{wahrer Meßwert}$	$b = \mu\text{g}$ Serotonin/ml	$W = \text{wahrer Meßwert}$
0,20	0,46	0,10	0,6750
0,20	0,46	0,10	0,6836
0,20	0,46	0,10	0,6808
0,20	0,48	0,10	0,6853
0,16	0,39	0,08	0,5502
0,16	0,38	0,08	0,5466
0,16	0,35	0,08	0,5440
0,16	0,35	0,08	0,5436
0,12	0,30	0,06	0,4106
0,12	0,29	0,06	0,4106
0,12	0,28	0,06	0,4072
0,12	0,28	0,06	0,4195
0,08	0,19	0,04	0,2787
0,08	0,18	0,04	0,2695
0,08	0,19	0,04	0,7223
0,08	0,21	0,04	0,2751
0,04	0,09	0,02	0,1301
0,04	0,08	0,02	0,1303
0,04	0,10	0,02	0,1276
0,04	0,10	0,02	0,1395
0,02	0,06	0,01	0,0717
0,02	0,04	0,01	0,0631
0,02	0,05	0,01	0,0675
0,02	0,04	0,01	0,0646

Verfahrenskonstante (42):

$$[\omega] = \frac{\Sigma bW}{\Sigma W^2} \mu\text{g/ml}$$

Standardabweichung (42) s_k :

$$s_k = \pm \sqrt{\frac{1}{f} \Sigma v_k^2} \mu\text{g/ml}$$

$$\Sigma v_k^2 = \Sigma b^2 - [\omega] \Sigma bW$$

	Blut	Harn
ΣbW	0,8254	0,603139
ΣW^2	1,9301	4,11559
$[\omega]$	0,42764	0,14655
$f = n - 1$	23	23
Σb^2	0,3536	0,0884
s_k	0,005	0,0006

tionsgemisch zwecks Entfernung des KBA-Überschusses mit 4 ml Azetylentetrachlorid 5 Minuten geschüttelt. 1 ml der wäßrigen Lösung wird dann bei der Aktivierungswellenlänge $\lambda = 385 \text{ m}\mu$ und der Fluoreszenzwellenlänge $\lambda = 455 \text{ m}\mu$ fluorimetriert. Die hierbei festgestellte Aminkonzentration entspricht gemäß oben Gesagtem der Summe an vorliegendem Serotonin und 5-Methoxytryptamin. Aus dieser ergibt sich die gesuchte Serotoninkonzentration durch Abzug des in einer Parallelanalyse unter Benzolextraktion ermittelten 5-Methoxytryptamingehaltes. Die Verfahrenskonstante (s. Tab. 4) beträgt für die Serotoninbestimmung im Harn $0,14 \mu\text{g}$ Amin/ml ($\pm s_k = 0,0006 \mu\text{g/ml}$).

5-Methoxytryptamin im Blut

Das Blut muß entweder unter Zusatz von 0,1 ml „Liquemin“ ungerinnbar gemacht oder sofort haemolysiert werden. 2 ml Blut werden mit 4,5 ml Aqua bidest. haemolysiert, zur Enteiweißung mit 0,5 ml 60-proz. Perchlorsäure 15 Minuten geschüttelt und

zur schnellen und vollständigen Sedimentation des ausgeflockten Eiweißes bei 4000 U/Min. 5 Minuten zentrifugiert. Von der klaren, stark sauren Lösung werden 4 ml abpipettiert, mit 33-proz. NaOH auf pH > 11 eingestellt und nach Zugabe von 2 g Natriumchlorid mit 20 ml Benzol extrahiert. Der weitere Analysengang entspricht dem der Aminbestimmung im Harn. — Die Verfahrenskonstante (s. Tab. 3) beträgt für die 5-Methoxytryptaminbestimmung im Blut $0,533 \mu\text{g}$ Amin/ml ($\pm s_k = 0,009 \mu\text{g/ml}$).

Serotonin (und 5-Methoxytryptamin) im Blut

2 ml Blut werden wie vorstehend haemolysiert, enteiweißt und zentrifugiert. 4 ml des klaren Überstandes werden mit Natriumkarbonat auf pH = 9–10 eingestellt, mit 2 g Natriumsulfat sowie 2 ml 0,5 molaren Boratpuffers versetzt, anschließend Serotonin und 5-Methoxytryptamin mit 20 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Der weitere Analysengang entspricht dem der gemeinsamen Bestimmung der Amine im Harn. Die Serotoninkonzentration

Z. klin. Chem. / 3. Jahrg. 1965 / Heft 5